

## **CONSEQÜÈNCIES FISIOLÒGIQUES D'UNA ACTIVACIÓ DEL SISTEMA IMMUNITARI SOBRE LA REPRODUCCIÓ I EL CREIXEMENT EN PEIXOS D'INTERÈS EN AQÜICULTURA**

NEREA ROHER,<sup>1,2</sup> DIEGO CRESPO,<sup>1</sup> YORYIA VRASKOU,<sup>1</sup> MÒNICA DÍAZ,<sup>1</sup>  
SIMON MACKENZIE<sup>2</sup> I JOSEP V. PLANAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona i Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona.*

<sup>2</sup>*Unitat de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Josep Planas. Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645, edifici Ramon Margalef. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: [jplanas@ub.edu](mailto:jplanas@ub.edu).

### **RESUM**

En peixos teleostis, una activació del sistema immunitari comporta la producció de factors immunitaris que ajuden a combatre una infecció i estableixen una comunicació entre la resposta immunitària innata i l'adaptativa. A part d'aquesta funció estrictament immunitària, els factors immunitaris poden afectar el funcionament d'altres cèl·lules i teixits no immunitaris. Dos processos particularment importants, tant per l'estat biològic d'una població de peixos, com per aspectes més relacionats amb la productivitat d'espècies en cultiu, són la reproducció i el creixement. En aquest treball es descriuen estudis encaminats a investigar els efectes d'una activació del sistema immunitari, i dels factors produïts, sobre la reproducció i el creixement en peixos teleostis.

**Paraules clau:** sistema immunitari, reproducció, creixement, infecció, peixos.

### **PHYSIOLOGICAL CONSEQUENCES OF THE ACTIVATION OF THE IMMUNE SYSTEM ON REPRODUCTION AND GROWTH IN FISH SPECIES IMPORTANT FOR AQUACULTURE**

### **SUMMARY**

In teleost fish, an activation of the immune system entails the production of immune factors that are key to fighting an infection and establish a bridge between the innate and

the adaptive immune responses. In addition to this strictly immune function, immune factors can also affect the function of other non-immune cells and tissues. Reproduction and growth are two processes that are particularly important for the biological condition of a population of fish as well as for aspects more related to productivity of cultured species. In this paper, we describe studies designed to investigate the effects of an activation of the immune system, as well as of the factors produced, on reproduction and growth in teleost fish.

**Key words:** immune system, reproduction, growth, infection, fish.

## INTRODUCCIÓ

El sistema immunitari en peixos, igual que en la resta de vertebrats, està encarregat principalment de la defensa de l'organisme contra factors biòtics externs, ja sigui en forma de bacteris, virus o fongs. Enfront d'aquestes amenaces externes, el sistema immunitari activa una complexa resposta humoral i cel·lular per destruir i eliminar de l'organisme els patògens infecciosos. Típicament, la resposta immunitària en vertebrats té dos components principals: *a*) la resposta innata i *b*) la resposta adaptativa. La resposta innata es caracteritza per l'atac per part de les cèl·lules immunitàries especialitzades (fagòcits) als patògens, i per l'activació amb l'alliberament de factors immunitaris (p. ex., citocines, quimiocines, factors bactericides) que actuen activant altres cèl·lules del sistema immunitari o sobre els patògens mateixos. D'altra banda, la resposta adaptativa es caracteritza per la producció d'anticossos i l'adquisició d'una «memòria» immunitària. Aquestes dues respostes no es produeixen independentment, sinó que tenen lloc de manera coordinada ja que, entre d'altres raons, la resposta innata és essencial per al desenvolupament de la resposta adaptativa posterior. En els peixos teleostis es presenten els dos tipus de resposta immunitària, però en aquest grup de vertebrats sembla que la resposta innata té un paper més rellevant que en vertebrats supe-

riors (Boshra *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Malgrat que encara és totalment especulatiu, es podria proposar que la major importància de la resposta innata en els peixos teleostis és deguda a la seva presència en un ambient aquàtic, en el qual els peixos podrien estar sotmesos a una major càrrega de patògens que els vertebrats terrestres (tetràpodes). En aquest sentit, seria interessant investigar si existeixen diferències entre tetràpodes que habiten ambients terrestres i aquàtics (aus aquàtiques i mamífers aquàtics) pel que fa a la resposta immunitària innata.

La resposta immunitària innata, tal com s'ha descrit en els tetràpodes, consisteix en primer lloc en l'activació de cèl·lules immunitàries per contacte amb el patògen gràcies al reconeixement dels motius específics dels patògens (patrons moleculars associats a patògens o PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) o a la resposta fagocítica de la cèl·lula immunitària mateixa en ingerir el patògen i degradar-lo. Aquesta primera resposta comporta la producció d'una primera bateria de factors immunitaris, en la qual destaquen les citocines (les «hormones» del sistema immunitari), que actuaran de manera paracrina i sistèmica sobre altres cèl·lules i teixits immunitaris (Nicola, 1994), i les quimiocines, que són factors que senyalitzen a altres cèl·lules immunitàries l'existència d'una reacció immunitària innata i les atreuen o recluten cap al lloc d'infecció per ajudar a combatre-la. D'aques-

ta manera, s'inicia una autèntica cascada de producció de factors immunitaris que aconsegueix posar en funcionament de manera coordinada en el temps i en l'espai tots els components del sistema immunitari necessaris per combatre una infecció. En realitat, existeix una cascada d'activació de citocines enormement complexa, en la qual aquestes s'activen de manera seqüencial i amplificant-se a cada pas (Nicola, 1994). Ja que moltes d'aquestes citocines (p. ex., la interleucina 1 o IL-1, el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  o TNF $\alpha$ , etc.) tenen activitat proapoptòtica i proinflamatòria, és absolutament essencial que la resposta immunitària innata pugui ser totalment controlada per garantir l'homeòstasi de l'organisme. De fet, la major part de factors immunitaris només són produïts per activació transcripcional sota condicions d'estimulació amb patògens o PAMP, i la seva expressió retorna als valors basals un cop l'estímul s'ha eliminat. És precisament quan la producció de citocines al llarg d'una infecció és incontrolable que es presenta una situació crítica (sepsi) que pot conduir a la mort de l'individu.

Tal com s'ha vist, una de les conseqüències importants d'una infecció és la producció massiva de citocines, bàsicament per part de les cèl·lules immunitàries. Un important problema fisiològic que es planteja en aquestes situacions d'activació del sistema immunitari innat és el dels possibles efectes de les citocines produïdes sobre les cèl·lules i teixits fora del sistema immunitari. En mamífers hi ha nombrosos estudis que donen suport a la idea que l'activació del sistema immunitari en un procés infecciós dona lloc a la producció de factors immunitaris que poden afectar altres processos fisiològics, tals com la reproducció i el creixement. En el present treball es pretén donar informació sobre els efectes de l'activació del sistema immunitari innat i de determinats mediadors immunitaris so-

bre la reproducció i el creixement en peixos teleostis. Concretament, la major part de la informació disponible (obtinguda principalment pel nostre grup i els nostres col·laboradors) sobre les conseqüències fisiològiques d'una activació del sistema immunitari s'ha obtingut utilitzant la truita (*Oncorhynchus mykiss*) com a model experimental. Això és degut, com es reconeix freqüentment, al fet que aquesta espècie és de considerable interès econòmic a Catalunya (representa una de les espècies més cultivades) i, des d'un punt de vista científic, al fet que es disposa d'una quantitat considerable d'informació sobre el seu sistema immunitari i la seva regulació, sobre la seva reproducció i sobre els factors que determinen el seu creixement muscular.

## EL SISTEMA IMMUNITARI I LA REPRODUCCIÓ EN PEIXOS

En els últims anys ha aparegut una quantitat important d'informació que indica que la capacitat reproductiva pot estar compromesa per processos infecciosos originats per patògens, principalment d'origen bacterià (Entrican i Wheelhouse, 2006; Sharara *et al.*, 1998). En mamífers, una activació del sistema immunitari innat deguda a l'administració de lipopolisacàrid (LPS), el component actiu de la paret dels bacteris gramnegatius, també anomenat *endotoxina*, provoca efectes negatius sobre la funció de l'ovari, la fertilitat i la supervivència embrionària, entre altres causes, per un augment de l'apoptosi i una reducció en la producció d'esteroides ovàrics en resposta a una estimulació gonadotròfica (Besnard *et al.*, 2001; Sancho-Tello *et al.*, 1993; Shakil *et al.*, 1994). En mamífers, també se sap que els efectes de l'LPS sobre la funció ovàrica estan mediats principalment per la citocina TNF $\alpha$ , la qual pot ser produïda de manera sistèmica

(per cèl·lules immunitàries circulants) o de manera local per macròfags residents o infiltrats en l'ovari. Per tant, sembla clar que els efectes negatius d'una infecció bacteriana sobre la reproducció són deguts, en gran part, a la producció i alliberació de citocines proinflamàtores i proapoptòtiques per part de les cèl·lules immunitàries. Malgrat això, cada cop sembla també més evident que les cèl·lules immunitàries i els factors que aquestes produeixen (incloent-hi les citocines) poden tenir un important paper fisiològic en la regulació de la funció gonadal (Wu *et al.*, 2004). En el cas de l'ovari dels mamífers, se sap que el TNF $\alpha$  és un regulador essencial del creixement i diferenciació ovàrics (Spaczynski *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1992) i que en el procés de l'ovulació, que des de fa anys s'ha identificat com un fenomen inflamatori, es produeixen nombrosos factors immunitaris essencials per al trencament del fol·licle ovàric i l'expulsió de l'oòcit (Richards *et al.*, 2008). És sorprenent, així doncs, que trobem en els teixits reproductors factors mediadors immunitaris tant en respostes immunitàries a infeccions amb patògens com en processos fisiològics normals. És possible que molts dels factors immunitaris produïts de manera fisiològica (és a dir, a concentracions fisiològiques baixes) al llarg de la reproducció passin a tenir accions negatives (p. ex., proapoptòtiques) quan la seva producció és enormement incrementada com a resultat de l'aparició d'estímuls patològics.

En peixos teleostis, existeix encara poca informació sobre els efectes d'una activació del sistema immunitari sobre el procés reproductiu. Ja que hi ha moltes espècies de peixos teleostis que es reproduïxen un cop a l'any, i que normalment produeixen i alliberen milers d'oòcits en el moment de l'ovulació, la incidència d'una infecció bacteriana en el moment de la posta pot posar en perill tot el conjunt de gàmetes que poden

donar lloc a una generació. Aquest problema és encara més patent en teleostis salmònids, en els quals, a causa del seu desenvolupament ovàric de tipus sincrònic, tots els fol·licles ovàrics presents dins dels ovaris es troben exactament en el mateix estat de desenvolupament. Fa alguns anys, el nostre grup de recerca va iniciar estudis per investigar els efectes d'una activació del sistema immunitari sobre la capacitat reproductiva en femelles de truita. Els estudis inicials van estar encaminats a estudiar els efectes de l'administració *in vivo* i *in vitro* de LPS sobre la funció ovàrica en femelles de truita en el període preovulatori (MacKenzie *et al.*, 2006b). Com a paràmetres fisiològics es va examinar, en primer lloc, la capacitat de producció d'esteroides ovàrics (testosterona i 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona) en resposta a l'hormona luteïnitzant (LH), gonadotrofina fisiològicament rellevant abans de l'ovulació (Planas i Swanson, 2007); en segon lloc, la capacitat de maduració oocitària en resposta a l'esteroides inductor de la maduració o MIS (17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxiprogesterona); en tercer lloc, la capacitat de contracció fol·licular; en quart lloc, la incidència d'apoptosi i, en últim lloc, els canvis d'expressió gènica en l'ovari. Aquests estudis van demostrar que l'administració de LPS, que en peixos s'ha vist que provoca una activació del sistema immunitari (Goetz *et al.*, 2004; MacKenzie *et al.*, 2006a, 2003), no altera la resposta esteroidogènica dels fol·licles ovàrics, la capacitat de madurar dels oòcits en resposta al MIS ni la contracció fol·licular induïda per l'adrenalina. Malgrat això, l'administració de LPS va provocar un important augment de l'apoptosi en les cèl·lules fol·liculars que envolten l'oòcit, la qual cosa es va veure acompanyada per canvis en l'expressió de gens implicats en la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi (MacKenzie *et al.*, 2006b). Ja que les cèl·lules fol·liculars afectades comprenen cèl·lules de la granulosa i

teca, responsables de la producció d'esteroides ovàrics i altres factors importants per al desenvolupament i maduració dels oòcits, és possible que l'administració de LPS tingui conseqüències negatives sobre l'ovari abans de l'ovulació en la truita. Per tant, podem dir que els peixos són sensibles, com els mamífers, als efectes proapoptòtics de LPS sobre l'ovari. Un altre resultat interessant obtingut en aquests estudis és el que fa referència a l'estimulació de la contracció en fol·licles incubats en presència de medi condicionat de macròfags de truita estimulats amb LPS *in vitro*. Això indica la presència d'algun factor(s) produït pels macròfags en resposta a l'LPS que estimula la contracció dels fol·licles ovàrics, la qual cosa suggereix que factors immunitaris podrien estar regulant el procés de contracció fol·licular, i en conseqüència l'ovulació, en peixos.

En relació amb l'estimulació de la contracció fol·licular per factors immunitaris, sorgeix la qüestió si l'ovulació en peixos pot estar modulada pel sistema immunitari. Per tal d'abordar aquest problema, el nostre grup, en col·laboració amb Julien Bobe (SCRIBE-INRA, Rennes, França), ha començat estudis per conèixer concretament els efectes d'una activació del sistema immunitari (mitjançant el conegut tractament amb LPS *in vivo*) sobre l'ovulació. Així doncs, s'ha pogut determinar que l'administració de LPS en femelles de truita en el període periovulatori provoca un avanç de l'ovulació (Crespo *et al.*, resultats no publicats) (vegeu la taula 1), la qual cosa concorda amb els resultats obtinguts *in vitro* amb medi condicionat de macròfags activats. Per tant, podem dir que l'activació del sistema immunitari per LPS, amb la conseqüent producció de citocines per part de les cèl·lules immunitàries, provoca el trencament de la paret fol·licular ovàrica i l'alliberament prematur dels oòcits (vegeu la figura 1). Tanmateix, s'ha examinat la viabilitat

i supervivència dels embrions que resulten d'oòcits ovulats prematurament com a resultat d'una immunoestimulació i s'ha observat que aquests embrions presenten una supervivència reduïda al voltant del 50 %, mesurada en els estadis d'aparició de l'ull (anglès, *eyed-stage*) i de reabsorció del sac vitel·lí (vegeu la taula 1). En resum, tenim per primer cop dades que indiquen clarament que una activació del sistema immunitari en femelles en el període ovulatori provoca un avanç de l'ovulació. Això comporta l'alliberament d'oòcits que no estan suficientment preparats per, un cop fertilitzats, donar lloc a embrions viables. Les conseqüències pràctiques d'aquests estudis són importants, ja que indiquen que qualsevol fenomen infecciós que tingui lloc en una població de reproductors al voltant del període de l'ovulació provocarà un avanç del mateix i una disminució important de la qualitat de la posta.

En l'ovari dels mamífers i aus es creu que els efectes proapoptòtics i proinflamatoris de l'LPS estan mediatos per la secreció de citocines proapoptòtiques i proinflamatòries com el TNF $\alpha$  (MacKenzie *et al.*, 2003). En segon lloc, TNF $\alpha$  s'expressa en l'ovari de la truita (Bobe i Goetz, 2001) i la seva expressió és estimulada per l'administració de LPS *in vivo* (Crespo i Planas, resultats no publicats). En tercer lloc, en l'ovari de la truita s'ha identificat un receptor *decoy* de TNF $\alpha$  i la seva expressió és elevada en les cèl·lules de la granulosa de l'ovari postovulatori (Bobe i Goetz, 2000). Aquest tipus de receptor és del tipus soluble i té la capacitat d'unir-se al TNF $\alpha$  i reduir la seva activitat biològica interferint amb la capacitat del TNF $\alpha$  d'unir-se als seus receptors de membrana. En el cas concret d'aquest receptor soluble de TNF $\alpha$ , el seu paper podria ser el de protegir el fol·licle postovulatori dels efectes proapoptòtics de la citocina. Per tal d'investigar el possible paper mediador de TNF $\alpha$

TAULA 1. Efectes de l'administració de lipopolisacàrid (LPS) sobre la incidència de l'ovulació i la supervivència de la progènie en femelles de truita en estadi preovulatori

	Salí	LPS
Ovulació (%)	35,3	67,06
Supervivència a l'estadi ullalet (%)	97,49 ± 0,9	41,59 ± 23,6
Supervivència a l'estadi de reabsorció del sac vitel·lí (%)	89 ± 4	52 ± 16

en la resposta ovàrica a l'LPS en la truita, hem generat TNF $\alpha$  recombinant de truita per examinar els seus efectes directes sobre els fol·licles ovàrics. Així doncs, hem observat que TNF $\alpha$  provoca una disminució en la viabilitat de les cèl·lules granuloses en fol·licles ovàrics exposats a aquesta citocina, i que aquest efecte és degut a un augment de l'apoptosi (Bonnet *et al.*, 2008). Per tant, podem proposar que en la truita els efectes proapoptòtics de l'LPS *in vivo* en l'ovari poden estar mediat pel TNF $\alpha$ . Malgrat que no es coneixen els efectes de TNF $\alpha$  sobre la contracció fol·licular i l'ovulació, podem dir que, fins ara, els resultats existents suggereixen que una activació del sistema immunitari en resposta a patògens abans de l'ovulació podria promoure l'apoptosi mediada per TNF $\alpha$  en l'ovari, avançar l'ovulació i, com a resultat, provocar una important davallada en la qualitat de la posta.

## EL SISTEMA IMMUNITARI I EL CREIXEMENT I METABOLISME EN PEIXOS

El múscul esquelètic és un dels compartiments cel·lulars més extensos en els vertebrats, i en peixos representa aproximadament un 60 % del pes corporal. El múscul esquelètic no solament és important per a la locomoció, sinó que té un paper essencial en l'homeòstasi metabòlica i nutricional de l'animal. En un procés infeccios com el que s'ha descrit abans, el múscul esquelètic

és una diana important per als factors immunitaris produïts com a resultat de l'activació del sistema immunitari. En mamífers, estats patològics greus com les infeccions cròniques o estats avançats de càncer, o els efectes metabòlics de la resposta inflammatòria sistèmica que es desenvolupa en resposta a estats patològics greus com infeccions cròniques o càncer, donen lloc molt freqüentment a un procés de destrucció tissular anomenat *caquèxia*. Aquest procés està caracteritzat típicament per elevats nivells de citocines en sang, i es pensa que les citocines són les responsables de la degradació de proteïnes del múscul esquelètic per proteòlisis (Rectenwald i Moldawer, 2002). Les proteïnes alliberades pel múscul esquelètic són utilitzades pel fetge per dur a terme la gluconeogènesi i pel sistema immunitari i pel tracte digestiu com a font d'energia. A part del fet que el múscul esquelètic és una diana important en processos infecciosos, cada vegada hi ha més dades que indiquen que aquest teixit té una capacitat immunològica pròpia, ja que pot participar en reaccions immunitàries locals i expressa una varietat sorprenent de factors immunitaris, tals com molècules de superfície, citocines i quimiocines, que confereixen un sistema protector a les fibres musculars (Nagaraju, 2001; Wiendl *et al.*, 2005).

En peixos teleostis, malauradament, no hi ha pràcticament informació disponible sobre les possibles conseqüències d'una infecció bacteriana sobre la funció del múscul esquelètic o sobre la possibilitat que aquest



teixit produeixi mediadors immunitaris. A causa de la importància del múscul esquelètic en el creixement i al fet que és la part de l'animal que es destina al consum humà, és important estudiar la resposta del múscul esquelètic en situacions d'immunoestimulació. Per aquest motiu, el nostre grup ha iniciat estudis per investigar els efectes d'una activació aguda del sistema immunitari sobre el múscul esquelètic de la truita mitjançant l'administració de LPS. En aquests estudis inicials s'ha abordat aquesta problemàtica des d'una perspectiva transcriptòmica i proteòmica per tal d'obtenir el patró de resposta global del múscul

esquelètic en relació amb els gens i proteïnes expressades en aquest teixit que responen específicament a l'activació del sistema immunitari (Roher *et al.*, 2007). L'anàlisi de metabòlits en sang i teixits en truites tractades amb LPS demostra que en la truita, com en els mamífers, hi ha una resposta metabòlica a l'LPS. Concretament, l'LPS provoca una mobilització de reserves energètiques, com es dedueix per la disminució del contingut de glicogen muscular i la disminució en plasma dels nivells de triglicèrids. Això indica que una activació del sistema immunitari per l'LPS implica una mobilització de reserves de glucosa en forma de glicogen i una utilització de triglicèrids per finançar el cost metabòlic de la infecció en l'hoste. Des del punt de vista del transcriptoma del múscul, podem distingir clarament dos tipus de resposta: una metabòlica i una altra immunitària (vegeu la figura 2). La resposta metabòlica a escala transcripcional està determinada per una disminució significativa de l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme dels carbohidrats i amb el metabolisme oxidatiu en el múscul vermell, que és el múscul esquelètic de contracció lenta i aeròbica. Concretament, l'LPS disminueix l'expressió de gens implicats en la via glicolítica, com l'enolasa, l'hexocinasa, la fosfofructocinasa i la glucosa-isomerasa. D'altra banda, en el múscul blanc, de contracció ràpida i anaeròbic, hi ha un augment significatiu de l'expressió d'aquests gens metabòlics en resposta a l'LPS, la qual cosa concorda amb els canvis observats en l'expressió de les proteïnes corresponents (per anàlisi proteòmica) d'aquests enzims de la via glicolítica. El que resulta particularment interessant és l'aparició de gens immunitaris expressats en el múscul esquelètic de la truita i regulats diferencialment pel tractament *in vivo* amb LPS. D'especial interès són els gens implicats en la presentació d'antígens que, en general, aug-

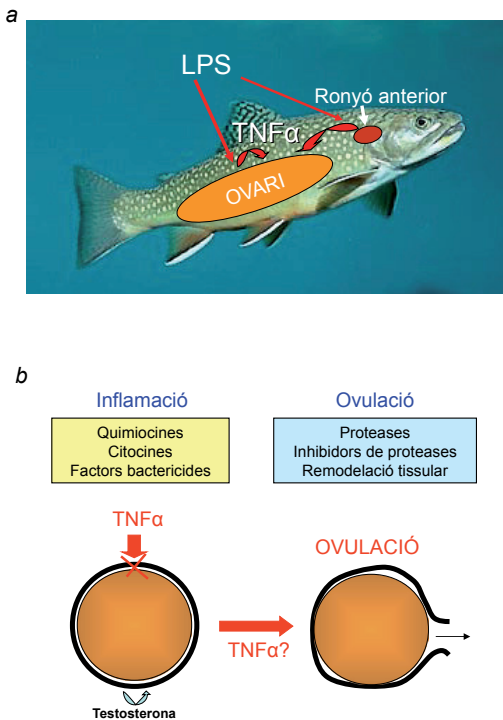


FIGURA 1. Relació entre el sistema immunitari i la reproducció en la truita. a) L'administració de lipopolisacàrid bacterià (LPS), a través de l'estimulació de la producció de la citocina TNF $\alpha$ , té efectes sobre l'ovari. b) El TNF $\alpha$  és un factor important en el procés inflamatori que té lloc durant l'ovulació.

menten la seva expressió en resposta a LPS. També són regulats de manera significativa per l'LPS gens implicats en la defensa contra patògens bacterians (p. ex., el precursor del lisozim C), i en la senyalització per citocines i quimiocines. Per tant, aquests resultats indiquen clarament que, com en els mamífers, el múscul esquelètic dels peixos teleostis està capacitat per presentar una resposta immunitària específica.

Igual com s'ha vist anteriorment en el cas de l'ovari, l'activació d'una resposta immunitària local o sistèmica pot afectar la funcionalitat del múscul esquelètic a causa de la producció de mediadors immunitaris com, per exemple, les citocines. En mamífers és ben conegut el fet que la secreció de citocines proinflamàtores, com per exemple el

TNF $\alpha$ , pot afectar l'activitat de les cèl·lules del teixit muscular. En l'obesitat, que avui dia es considera una condició inflamatòria crònica (Dandona *et al.*, 2004), els nivells plasmàtics de TNF $\alpha$  són elevats (Li i Reid, 2001) i hi ha molts estudis que apunten que el TNF $\alpha$  provoca resistència a la insulina, ja que actua sobre els teixits sensibles a la insulina, com són el múscul esquelètic, el teixit adipós i el fetge (Ruan *et al.*, 2002), i té efectes importants sobre el metabolisme dels lípids, proteïnes i carbohidrats. De fet, el TNF $\alpha$  va ser anomenat inicialment *cachectina*, a causa dels seus efectes catabòlics quan el seu nivell en sang són elevats (en situacions patològiques com la sepsi o el càncer) i que, en casos extrems, resulten en una pèrdua de massa muscular important. Avui dia se sap que el TNF $\alpha$  pot actuar directament sobre les cèl·lules musculars i que aquestes presenten receptors funcionals per a aquest factor (Zhang *et al.*, 2000). Un dels principals efectes d'aquesta citocina que condueixen a la resistència a la insulina és la seva capacitat per inhibir la captació de glucosa estimulada per la insulina a causa de la seva inhibició sobre el moviment del transportador de glucosa GLUT4 cap a la membrana plasmàtica, tal i com s'ha demostrat en cèl·lules musculars de ratxa (Alvaro *et al.*, 2004) i en la línia cel·lular L6 (Bedard *et al.*, 1997). Tanmateix, el TNF $\alpha$  té efectes sobre el creixement i diferenciació del múscul esquelètic, ja que inhibeix la diferenciació miogènica, bloqueja els efectes estimuladors de l'IGF-I sobre l'expressió de miogenina (Broussard *et al.*, 2003) i inhibeix l'expressió de MyoD, un important regulador de la diferenciació del múscul esquelètic. Malgrat això, hi ha presents en la literatura diversos estudis que demostren que el TNF $\alpha$  no té efectes inhibidors sobre la captació de glucosa sinó que, al contrari, fins i tot pot arribar a incrementar la capacitat del múscul per captar glucosa. Per tant,

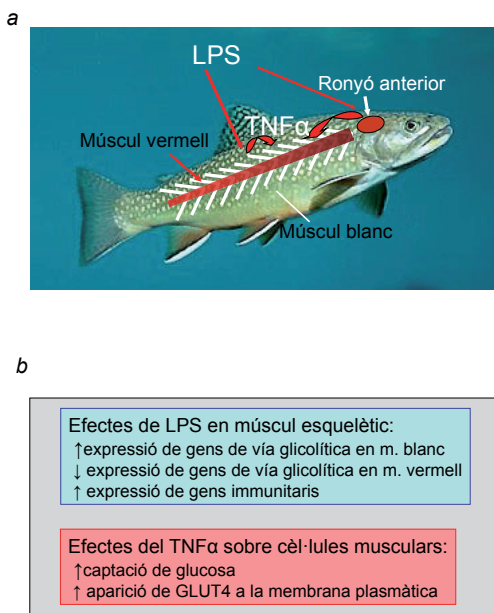


FIGURA 2. Relació entre el sistema immunitari i el creixement en la truita. a) L'administració de lipopolisacàrid bacterià (LPS), a través de l'estimulació de la producció de la citocina TNF $\alpha$ , té efectes sobre el múscul esquelètic. b) Efectes de l'LPS i el TNF $\alpha$  sobre el múscul esquelètic en la truita.



existeix avui dia la possibilitat que el TNF $\alpha$  no sigui per si sol el responsable de la resistència a la insulina en mamífers (Ciaraldi *et al.*, 1998).

En relació amb el possible paper del TNF $\alpha$  en peixos teleostis, hi ha multitud d'estudis que han caracteritzat els peixos teleostis, i concretament els salmònids, com a organismes intolerants a la insulina (Moon, 2001). Malgrat aquesta idea, estudis recents han demostrat que això no és totalment cert, i que la insulina, com en mamífers, incrementa, per un costat, la quantitat total (tant de proteïna com de mRNA) de GLUT4 en el múscul esquelètic (Capilla *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2007b) i, per un altre costat, estimula l'aparició de GLUT4 a la membrana plasmàtica de manera ràpida (Diaz *et al.*, 2007a). Aquests resultats indiquen que la regulació de la captació de glucosa per la insulina en peixos teleostis es realitza a través del transportador de glucosa GLUT4 (Capilla *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2007a). Per tant, un cop establert que els peixos teleostis no són realment resistents a la insulina, existeix la possibilitat que l'expressió i el moviment de GLUT4 cap a la membrana plasmàtica en les cèl·lules del múscul esquelètic en peixos teleostis estigui regulada per citocines produïdes pel sistema immunitari. Tal com s'ha indicat abans, els macròfags activats de truita produeixen TNF $\alpha$  en resposta a un estímul immunològic com és l'LPS (MacKenzie *et al.*, 2003) i també s'ha demostrat que el TNF $\alpha$  actua sobre el teixit adipós de la truita mobilitzant lípids (Albalat *et al.*, 2005). Per tal d'investigar sobre una possible acció del TNF $\alpha$  sobre el múscul esquelètic de la truita, el nostre grup ha utilitzat dos models cel·lulars per establir els efectes directes del TNF $\alpha$ . En primer lloc, s'ha utilitzat un cultiu primari de cèl·lules musculars de truita en el qual s'han descrit la presència de receptors d'insulina i IGF-I i els efectes metabòlics d'aquestes dues hormo-

nes (Castillo *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2002). Utilitzant TNF $\alpha$  recombinant de truita en aquest model cel·lular, hem demostrat que el TNF $\alpha$ , a concentracions no patològiques, té efectes estimuladors sobre la captació de glucosa, igual com s'ha demostrat en la línia cel·lular muscular de rata L6 (Roher *et al.*, 2008). En segon lloc, hem utilitzat una línia cel·lular L6 que expressa de manera estable el GLUT4 de truita (Diaz *et al.*, 2007a) i hem demostrat també que els efectes estimuladors de TNF $\alpha$  sobre la captació de glucosa són deguts a l'estimulació per part del TNF $\alpha$  del moviment de GLUT4 de truita cap a la membrana plasmàtica. Per tant, la citocina proinflamàtoria TNF $\alpha$ , a concentracions fisiològiques, pot potenciar la captació de glucosa per part del múscul esquelètic. Això suggereix, tal com s'ha indicat en mamífers, que TNF $\alpha$  possiblement és un factor immunitari amb un paper fisiològic rellevant quant a la regulació del metabolisme dels carbohidrats en peixos teleostis. Malgrat això, no es coneixen els efectes d'una alliberació massiva de TNF $\alpha$  sobre el múscul esquelètic en situacions d'una inflamació important.

## CONCLUSIONS

Amb aquests estudis s'han descrit els efectes d'una activació del sistema immunitari sobre la funció ovàrica i la funció del múscul esquelètic en peixos teleostis. Aquests estudis poden establir la base per a futurs estudis destinats a examinar amb més detall les conseqüències reals d'una infecció sobre la reproducció i el creixement. Aquests estudis ens aportaran dades sobre els efectes patològics d'una infecció sobre aquests dos processos, però també provaran l'important paper que poden tenir factors típicament produïts pel sistema immunitari en la funció normal (fisiològica) en

teixits no immunitaris, com les gònades i el múscul esquelètic.

## BIBLIOGRAFIA

- ALBALAT, A.; LIARTE, C.; MACKENZIE, S.; TORT, L.; PLANAS, J. V.; NAVARRO, I. (2005). «Control of adipose tissue metabolism by tumor necrosis factor alpha in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *J. Endocrinol.*, 184: 527-534.
- ALVARO, C.; TERUEL, T.; HERNANDEZ, R.; LORENZO, M. (2004). «Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner». *J. Biol. Chem.*, 279: 17070-17078.
- BEDARD, S.; MARCOTTE, B.; MARETTE, A. (1997). «Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase». *Biochem. J.*, 325: 487-493.
- BESNARD, N.; HORNE, E. A. L.; WHITEHEAD, S. A. (2001). «Prolactin and lipopolysaccharide treatment increased apoptosis and atresia in rat ovarian follicles». *Acta Physiol. Scand.*, 172: 17-25.
- BOBE, J.; GOETZ, F. W. (2000). «A tumor necrosis factor decoy receptor homologue is up-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary at the completion of ovulation». *Biol. Reprod.*, 62: 420-426.
- BOBE, J.; GOETZ, F. W. (2001). «Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary». *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 129: 475-481.
- BONNET, E.; CRESPO, D.; ROHER, N.; MACKENZIE, S.; GOETZ, F. W.; BOBE, J.; PLANAS, J. V. (2008). «Reproductive consequences of an immune challenge during the preovulatory period in trout: possible mediatory role of tumor necrosis factor  $\alpha$ ». *Cy-bium*. [En premsa]
- BOSHRA, H.; WANG, T.; HOVE-MADSEN, L.; HANSEN, J.; LI, J.; MATLAPUDI, A.; SECOMBES, C. J.; TORT, L.; SUNYER, J. O. (2005). «Characterization of a C3a receptor in rainbow trout and *Xenopus*: the first identification of C3a receptors in nonmammalian species». *J. Immunol.*, 175: 2427-2437.
- BROUSSARD, S. R.; MCCUSKER, R. H.; NOVAKOVSKI, J. E.; STRLE, K.; SHEN, W. H.; JOHNSON, R. W.; FREUND, G. G.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. (2003). «Cytokine-hormone interactions: tumor necrosis factor alpha impairs biologic activity and downstream activation signals of the insulin-like growth factor I receptor in myoblasts». *Endocrinology*, 144: 2988-2996.
- CAPILLA, E.; DIAZ, M.; ALBALAT, A.; NAVARRO, I.; PESSIN, J. E.; KELLER, K.; PLANAS, J. V. (2004). «Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue». *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 287: E348-357.
- CAPILLA, E.; DIAZ, M.; GUTIERREZ, J.; PLANAS, J. V. (2002). «Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle». *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 283: E44-49.
- CASTILLO, J.; CODINA, M.; MARTINEZ, M. L.; NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. (2004). «Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout». *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286: R935-941.
- CASTILLO, J.; LE BAIL, P. Y.; PABOEUF, G.; NAVARRO, I.; WEIL, C.; FAUCONNEAU, B.; GUTIERREZ, J. (2002). «IGF-I binding in primary culture of muscle cells of rainbow trout: changes during in vitro development». *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 283: R647-652.
- CIARALDI, T. P.; CARTER, L.; MUDALIAR, S.; KERN, P. A.; HENRY, R. R. (1998). «Effects of tumor necrosis factor-alpha on glucose metabolism in cultured human muscle cells from nondiabetic and type 2 diabetic subjects». *Endocrinology*, 139: 4793-4800.
- DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. (2004). «Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes». *Trends Immunol.*, 25: 4-7.
- DIAZ, M.; ANTONESCU, C. N.; CAPILLA, E.; KLIP, A.; PLANAS, J. V. (2007a). «Fish glucose transporter (GLUT)-4 differs from rat GLUT4 in its traffic characteristics but can translocate to the cell surface in response to insulin in skeletal muscle cells». *Endocrinology*, 148: 5248-5257.
- DIAZ, M.; CAPILLA, E.; PLANAS, J. V. (2007b). «Physiological regulation of glucose transporter (GLUT4) protein content in brown trout (*Salmo trutta*) skeletal muscle». *J. Exp. Biol.*, 210: 2346-2351.
- ENTRICAN, G.; WHEELHOUSE, N. M. (2006). «Immunity in the female sheep reproductive tract». *Vet. Res.*, 37: 295-309.
- GOETZ, F. W.; ILIEV, D. B.; MCCAULEY, L. A. R.; LIARTE, C. Q.; TORT, L. B.; PLANAS, J. V.; MACKENZIE, S. (2004). «Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages». *Mol. Immunol.*, 41: 1199-1210.
- LI, J.; BARREDA, D. R.; ZHANG, Y. A.; BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; LAPATRA, S.; TORT, L.; SUNYER, J. O. (2006). «B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities». *Nat. Immunol.*, 7: 1116-1124.
- LI, Y. P.; REID, M. B. (2001). «Effect of tumor necrosis

- factor-alpha on skeletal muscle metabolism». *Curr. Opin. Rheumatol.*, 13: 483-487.
- MACKENZIE, S.; ILIEV, D.; LIARTE, C.; KOSKINEN, H.; PLANAS, J. V.; GOETZ, F. W.; MOLSA, H.; KRASNOV, A.; TORT, L. (2006a). «Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol». *Mol. Immunol.*, 43: 1340-1348.
- MACKENZIE, S.; MONTERRAT, N.; MAS, M.; ACERETE, L.; TORT, L.; KRASNOV, A.; GOETZ, F. W.; PLANAS, J. V. (2006b). «Bacterial lipopolysaccharide induces apoptosis in the trout ovary». *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 4: 46.
- MACKENZIE, S.; PLANAS, J. V.; GOETZ, F. W. (2003). «LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages». *Develop. Comp. Immunol.*, 27: 393-400.
- MOON, T. W. (2001). «Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?». *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 129: 243-249.
- NAGARAJU, K. (2001). «Immunological capabilities of skeletal muscle cells». *Acta Physiol. Scand.*, 171: 215-223.
- NICOLA, N. A. (1994). *Guidebook to cytokines and their receptors*. Nova York: Oxford University Press.
- PLANAS, J. V.; SWANSON, P. (2007). «Physiological function of gonadotropins in fish». A: ROCHA, M. J.; ARUKWE, A.; KAPOOR, B. G. [ed.]. *Fish reproduction*. Enfield: Science Publishers, 37-66.
- RECTENWALD, J. E.; MOLDAWER, L. L. (2002). «Skeletal muscle and cytokines in sepsis and severe injury». A: PREEDY, V. R.; PETERS, T. J. [ed.]. *Skeletal muscle: pathology, diagnosis and management of disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 301-310.
- RICHARDS, J. S.; LIU, Z.; SHIMADA, M. (2008). «Immune-like mechanisms in ovulation». *Trends Endocrinol. Metab.*, 19: 191-196.
- ROHER, N.; KRASNOV, A.; MACKENZIE, S.; PLANAS, J. V. (2007). «Transcriptomic and proteomic analyses of skeletal muscle in LPS stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Aquaculture*, 272: S305-S306.
- ROHER, N.; SAMOKHALOV, V.; DIAZ, M.; MACKENZIE, S.; KLIP, A.; PLANAS, J. V. (2008). «The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha increases the amount of glucose transporter-4 at the surface of muscle cells independently of changes in interleukin-6». *Endocrinology*, 149: 1880-1889.
- RUAN, H.; HACOEN, N.; GOLUB, T. R.; PARIJS, L. VAN; LODISH, H. F. (2002). «Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory». *Diabetes*, 51: 1319-1336.
- SANCHO-TELLO, M.; TASH, J. S.; ROBY, K. F.; TERRANOVA, P. F. (1993). «Effects of lipopolysaccharide on ovarian function in the pregnant mare serum gonadotropin-treated immature rat». *Endocr. J.*, 1: 503-512.
- SHAKIL, T.; SNELL, A.; WHITEHEAD, S. A. (1994). «Effects of lipopolysaccharide and cyclosporin on the endocrine control of ovarian function». *J. Reprod. Fertil.*, 100: 57-64.
- SHARARA, F. I.; SEIFER, D. B.; FLAWS, J. A. (1998). «Environmental toxicants and female reproduction». *Fertil. Steril.*, 70: 613-622.
- SPACZYNSKI, R. Z.; ARICI, A.; DULEBA, A. J. (1999). «Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells». *Biol. Reprod.*, 61: 993-998.
- WANG, L. J.; BRANNSTROM, M.; ROBERTSON, S. A.; NORMAN, R. J. (1992). «Tumor necrosis factor alpha in the human ovary: presence in follicular fluid and effects on cell proliferation and prostaglandin production». *Fertil. Steril.*, 58: 934-940.
- WIENDL, H.; HOHLFELD, R.; KIESEIER, B. C. (2005). «Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment». *Trends Immunol.*, 26: 373-380.
- WU, R.; HOEK, K. H. VAN DER; RYAN, N. K.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. (2004). «Macrophage contributions to ovarian function». *Hum. Reprod. Update*, 10: 119-133.
- ZHANG, Y.; PILON, G.; MARETTE, A.; BARACOS, V. E. (2000). «Cytokines and endotoxin induce cytokine receptors in skeletal muscle». *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279: E196-205.